FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

Année 1975

No 95

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

François LEMONNIER

né le 13 Novembre 1944 à BRECEY

Présentée et soutenue publiquement le :

PURIFICATION DE L'ALDOLASE B HUMAINE

EFFETS DES REDUCTEURS DES GROUPEMENTS THIOLS SUR LES CONSTANTES CINETIQUES DE L'ALDOLASE DE L'INTOLERANCE HEREDITAIRE AU FRUCTOSE

Président : Monsieur J. C. DREYFUS, Professeur

FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

Année 1975 No

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

François LEMONNIER

né le 13 Novembre 1944 à BRECEY

Présentée et soutenue publiquement le :

PURIFICATION DE L'ALDOLASE B HUMAINE

EFFETS DES REDUCTEURS DES
GROUPEMENTS THIOLS SUR LES
CONSTANTES CINETIQUES DE L'ALDOLASE
DE L'INTOLERANCE HEREDITAIRE
AU FRUCTOSE

Président : Monsieur J. C. DREYFUS, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma femme et à mes enfants que j'aime.

A mes parents, à mon frère et à mes sœurs.

A mes beaux-parents.

A mes beaux-frères et à mes belles-sœurs.

A toute ma famille.

A mes amis.

Au Professeur J. C. DREYFUS

Biologiste des Hôpitaux

que je remercie de présider cette thèse.

A Madame le Docteur F. SCHAPIRA

Directeur de Recherche au C. N. R. S.

qui, en me permettant de collaborer au travail de son équipe, et en me guidant dans mon travail, a permis la réalisation de cette thèse.

A mes Maîtres d'Externat ,

Messieurs les Doyens J. PORIN

A. VALLA

Messieurs les Professeurs R. VILLEY,

Jacques L'HIRONDEL, Jean L'HIRONDEL,

J. GUICHARD, E. POILPRE, P. MORIN.

A mes Maîtres d'Internat ,

Monsieur le Professeur H. ADAM,

Monsieur le Professeur M. GAULTIER

Monsieur le Professeur M. LAMOTTE

Monsieur le Professeur P. LAJOUANINE

Monsieur le Professeur H. MATHIEU
qui m'a enseigné la rigueur nécessaire à la démarche médicale,

Monsieur le Professeur C. POLONOVSKI
dont j'ai apprécié l'étendue des connaissances,

Monsieur le Professeur D. ALAGILLE

et Monsieur le Professeur ODIEVRE
qui m'ont orienté vers ce sujet de thèse, et qui, en nous confiant les biopsies hépatiques de leurs malades, en ont permis la réalisation.

Monsieur le Professeur ROYER
que j'admire,

Monsieur le Professeur N. CHELLOUL,

En remerciement pour l'enseignement qu'ils m'ont donné.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548117_0015

-PURIFICATION DE L'ALDOLASE B HUMAINE.

-EFFETS DES REDUCTEURS DES GROUPEMENTS THIOLS SUR LES CONSTANTES CINETIQUES DE L'ALDOLASE DE L'INTOLERANCE HEREDITAIRE AU FRUCTOSE.

PLAN

Pages

I - INTRODUCTION..... 1

II - RAPPEL DES CONNAISSANCES ACTUELLES..... 3

A - Aldolases animales, définition, différents types..... 3

B - Caractères généraux des aldolases animales.. 5

C - Propriétés des aldolases B animales et humaines (normales et de malades atteints d'intolérance héréditaire au Fructose)..... 9

III - MATERIEL ET METHODES..... 14

A - Dosage de l'activité aldolasique..... 14

B - Méthodes électrophorétiques..... 16

C - Méthodes immunologiques..... 19

D - Etude de la constante de Michaelis..... 20

IV - RESULTATS 22

A - Purification de l'aldolase B humaine normale..... 22

B - Focalisation par électrophorèse en gradient de pH..... 33

C - Effets des réducteurs de groupements thiols sur l'activité catalytique de l'aldolase B et sur son affinité envers le fructose 1 phosphate..... 36

V - RESULTATS - CONCLUSIONS..... 43

VI - BIBLIOGRAPHIE..... 45

I - INTRODUCTION

L'Aldolase B humaine est un type d'aldolase qui est présent dans le tissu hépatique, rénal, et dans la muqueuse de l'intestin grêle. Dans le tissu hépatique, la presque totalité des aldolases est de type B.

Elle catalyse,réversiblement, la scission du Fructose 1-6 diphosphate (F 1-6 P) en phosphodihydroxyacétone et phosphoglyceraldehyde. Cette étape est commune à la glycolyse anaérobie et à la néoglucogénèse.

Elle catalyse également, de manière réversible, la scission du Fructose 1 Phosphate (F 1 P) en phosphodihydroxyacétone et glyceraldéhyde non phosphorylée.

Elle est indispensable au métabolisme du Fructose, permettant, après que celui-ci ait été transformé en Fructose 1 Phosphate sous l'action de la Fructokinase, son incorporation dans la voie de la glycolyse ou de la néoglucogénèse.

L'activité élevée de l'aldolase B vis-à-vis du Fructose 1 phosphate est d'ailleurs la caractéristique fonctionnelle fondamentale de ce type d'aldolase.

L'intolérance héréditaire au fructose (IHF) est une maladie génétique, caractérisée par un déficit de l'activité Fructose 1-6 diphos-

pho aldolasique (F 1 6 P aldolasique), et davantage de l'activité Fructose 1 phosphoaldolasique (F 1 P aldolasique).

Ce déficit apparait lié très certainement à une modification structurale de l'aldolase B , toutefois, les connaissances actuelles concernant cette modification restent très fragmentaires.

Le travail,rapporté dans cette thèse, comporte trois parties :

-purification de l'aldolase B humaine normale,

-séparation, en gradient de pH, de plusieurs formes, enzymatiquement actives, de cette aldolase,

-étude de l'effet sur les constantes cinétiques de l'aldolase B de malade atteint d'intolérance héréditaire au Fructose, des agents réducteurs de groupements thiols.

———

II - RAPPEL DES CONNAISSANCES ACTUELLES

A/ ALDOLASES ANIMALES. DEFINITION, DIFFERENTS TYPES.

- Les aldolases animales (EC 4 -1 - 2 - 13) se différencient de celles des micro-organismes par l'absence de cofacteur.
- Elles catalysent réversiblement la scission du Fructose 1-6 diphosphate et du Fructore 1-Phosphate, en phosphodihydroxyacétone et glyceraldehyde phosphorylée ou non selon le substrat.
- Le dihydroxyacétone phosphate est le substrat spécifique de l'aldolase. Lorsque l'enzyme catalyse la réaction d'addition, alors que la spécificité vis-à-vis du phosphodihydroxyacétone est très rigoureuse, celle pour l'aldéhyde l'est beaucoup moins. Ainsi, les aldéhydes à 2, 3 ou 4 carbones, phosphorylés ou non sur leur carbone terminal, voire même porteurssur ce carbone d'un radical différent (méthyl par exemple) peuvent être condensés par l'enzyme, avec le phosphodihydroxyacétone.
- Trois types, A, B et C, d'Aldolases animales ont été individualisés.

L'Aldolase de type A, ou musculaire, a été cristallisée en 1943 par O. WARBURG et W. CHRISTIAN (2),

L'Aldolase de type B est la forme prédominante dans le tissu hépatique. Son individualisation s'est faite en plusieurs étapes :

-HERS et coll. (3) (4) et, simultanément LEUTHARDT et coll. (5) (6), soulignent l'importance de l'activité F 1 P aldolasique d'extraits hépatiques,

-LEUTHARDT, en 1953, croyant que l'aldolase de muscle n'agit pas sur le Fructose 1 phosphate, conclut à l'existence d'un enzyme portant spécifiquement cette activité dans le tissu hépatique, et différent de l'enzyme musculaire, qui n'aurait que l'activité F 1-6 P aldolasique (7).

-Ceci s'est avéré inexact à la suite des travaux de HERS (8) et F. SCHAPIRA (9) (10), qui montrent que les activités F 1 P aldolasique et F 1-6 P aldolasique hépatiques ne peuvent être dissociées, et suggèrent que ces deux activités sont portées par un seul enzyme.

-PEANASKY et coll. (11) confirment cette hypothèse, en purifiant l'aldolase hépatique de bovin (type B). Ils montrent qu'elle por les deux activités.

L'Aldolase de type C, forme qui, chez l'homme, est surtout présente dans le tissu cérébral, a été individualisée en 1966, simultanément par PENHOET et coll. (12) et par RENSING et coll. (13), à partir du tissu cérébral du Lapin.

B/ CARACTERES GENERAUX DES ALDOLASES DES ANIMAUX SUPERIEURS.

Elles ont en commun :

-leur poids moléculaire, voisin de 160. 000,

-leur structure tétramérique, et les possibilités d'hybridation entre sous-unités de type différent, point sur lequel nous reviendrons,

-leur activité vis-à-vis du Fructose 1-6-diphosphate et du Fructose 1-phosphate,

-le mécanisme réactionnel, qui comporte la formation d'une base de Schiff, entre un résidu Lysine du site enzymatique, et le carbone porteur de la fonction cétone du substrat (HORECKER).

Elles se différencient à l'opposé par:

-le rapport de l'activité vis-à-vis du F-1-6-P et vis-à-vis du F-1-P :

	Aldolase A	Aldolase B	Aldolase C
Rapport F-1-6-P / F-1-P	> 50	1	5 à 10 selon les espèces

-leur prédominance selon les tissus :

. tissu musculaire : Aldolase A

. tissu hépatique : Aldolase B

. tissu cérébral : Aldolase C, beaucoup plus ubiquitaire toutefois chez les oiseaux et les ruminants

-leur migration électrophorétique, l'aldolase C étant le plus négativement chargée à pH 7.

Formation d'hybrides entre les sous-unités des différents types d'aldolase.

Chaque type d'aldolase, A, B ou C, est constitué de 4 sous-unités dont les compositions en acides aminés sont, à l'intérieur d'une même espèce, très différentes (14) (15).

Les différences sont à l'opposé peu importantes d'une espèce à l'autre, entre les sous-unités d'aldolase du même type (16)(17).

Les sous-unités d'un type d'aldolase peuvent reconstituer des tétramères avec les sous-unités d'un autre type. Dans le cas d'une hybridation AC par exemple, on peut, par électrophorèse, caractériser 5 isozymes correspondant aux tétramères A_4, A_3C, A_2C_2, AC_3, C_4 (12)

-In vitro, par dissociation-réassociation, toutes les possibilités d'hybridation, au sein d'une même espèce, ont pu être obtenues (18).

-Toutefois, in vivo, alors que les hybrides A-C sont toujours retrouvées, les hybrides A-B ou surtout B-C le sont plus rarement, même au sein des tissus synthétisant simultanément ces deux types d'aldolases (19) (20).

-Ces trois types d'aldolases répondent ainsi à la définition des isozymes, retenue par les commissions de nomenclature (1964) (1971). Les isozymes sont des enzymes qui catalysent, dans un même tissu d'une même espèce, une même réaction principale, mais qui diffèrent par l'un des caractères suivants : charge, constante d'affinité, thermostabilité, action des effecteurs, ou même action vis-à-vis d'autres substrats.

De plus, les isozymes sont sous des commandes génétiques distinctes (ce qui les différencie des allèles) et sont synthétisés dans un

même tissu du même organisme (ce qui les différencie des hétéro-enzymes).

La constatation d'hybrides in vivo conduit à admettre qu'une même cellule synthétise simultanément les sous-unités correspondant à deux types d'aldolases.

Les travaux de WEBER (21) (22) sur le tissu hépatique du Rat, précédés par ceux du laboratoire (23) sur le tissu hépatique de l'homme, ont montré que, au cours de l'ontogénèse hépatique, la synthè d'aldolase A, prédominante dans le tissu embryonnaire, laissait place à la synthèse d'aldolase B, prédominante dans le tissu adulte. Cette tran sition survenant à la période d'apparition de la glycogénogénèse.

Le même phénomène s'observe entre les aldolases B et C du tissu hépatique de Poulet (21).

Ces variations quantitatives des différents types d'aldolase au cours du développement d'un tissu, constituent ainsi un moyen d'étud de l'ontogénèse de ce tissu au niveau moléculaire.

Inversement, dans certains tissus tumoraux (hépatomes), les travaux du laboratoire ont montré que les proportions des types d'aldolases se rapprochent des proportions fœtales. (23) (24).

Hétérogénéité des sous-unités d'un même type.

-Aux hybridations, conséquences du regroupement en téra mère de sous-unités de types différents, se surajoute une hétérogénéité des sous-unités d'un même type.

-Elle a été mise en évidence, en 1967, par CHAN (25) qui constate la migration électrophorétique en deux bandes, de l'aldolase A de Lapin dans des conditions dénaturantes (urée 6M).

-Cette hétérogénéité est décelable par électrofocalisation, et donne un profil d'élution comportant 5 pics (26).

-En utilisant des peptides marqués, il a été prouvé pour l'aldolase A de Lapin que les sous-unités α' dérivaient des sous-unités α, par une desamidation in vivo, d'un résidu Asparagine (27)(28).

-Les 5 pics observés correspondant aux différentes combinaisons possibles, dans le cadre d'une structure tétramérique, entre les sous-unités non desamidées et desamidées.

-Les différences entre ces sous-unités étant la conséquence de remaniements ultérieurs à la traduction, ne constituent pas de véritables isozymes.

-KOIDA (29) et coll. ont montré que l'aldolase de très jeunes lapins ne contenait que très peu de subunités α', alors que les deux types sont en nombre égal chez le lapin adulte.

C/ PROPRIETES DES ALDOLASES B ANIMALES, HUMAINES, ET DE FOIE D'INTOLERANCE HEREDITAIRE AU FRUCTOSE.

Nous rappelerons les connaissances acquises concernant l'aldolase B des animaux de laboratoire (lapin -rat) qui servent de référence. Puis nous regrouperons celles plus récentes concernant l'aldolase B humaine normale et celles concernant l'aldolase B de l'intolérance héréditaire au fructose.

Aldolase B des animaux de laboratoire.

-Différenciée de l'aldolase A, à la suite des travaux de HERS - F. SCHAPIRA-RUTTER, comme il a été signalé plus haut, l'aldolase B de Lapin a été purifiée par RAJKUMAR et RUTTER (30) selon une technique modifiée ultérieurement par PENHOET (31), et par GRACY et HORECKER (32).

-Ses caractéristiques sont assez bien connues

. Sur le plan structural:

-Poids moléculaire : 158. 000 (lapin) (32)

-Structure tétramérique - HORECKER (32)

-Si l'hybridation in vitro est possible, au sein d'une même espèce, entre toutes les sous-unités, des différents types d'aldolase, in vivo ont été retrouvés:

Hybrides AB (Rat) tissu hépatique - PENHOET (12)

A l'opposé, ainsi qu'il a déjà été souligné, la recherche d'hybrides BC est restée négative dans le tissu hépatique de tous les mammifères (19).

-Jusqu'à présent, une hétérogénéité des sous-unités constitutives de l'aldolase B de Lapin et de Rat n'a pas été décelée.

. Sur le plan cinétique enzymatique, les valeurs admises par l'ensemble des auteurs sont :

KmFDP : 1×10^{-6} M/e

Km F1P : 3×10^{-4} M/e

Rapport d'activité F-1-6-P/F-1-P · 1

pH optimum : 7, 7

Activité spécifique : 2, 5 à 3, 5 UI par mg de protéine à 25°.

Aldolase B humaine normale

-A été purifiée par ·

GURTLER et LEUTHART (16)

EAGLES et IGBAL (17)

et plus récemment par PFEIDERER et DIKOW (33).

-Ses caractéristiques structurales ·

-Poids moléculaire : 156. 000 - GURTLER et LEUTHART (16)

-Structure tétramérique et hétérogénéité des sous-unités d'un même type d'aldolase, donnant en électrofocalisation un profil d'élution à 5 bandes : GURTLER (34).

-Ses caractéristiques cinétiques ·

Km FDP : 2, 5 à 3, 0 10^{-6} GURTLER (17) - IQBAL (17)

Km F1P : $1, 2 \times 10^{-3}$ IQBAL - $3, 0 \times 10^{-3}$ GURTLER

pH optimum : 7, 2

Activité spécifique (à 25°) : 1, 1 UI/mg de protéine IQBAL
1, 6 UI /mg protéines GURTLER

Aldolase B de l'intolérance au fructose.

L'aldolase B, ayant une activité catalytique vis-à-vis du F-1-P, assure au niveau hépatique l'incorporation du Fructose-1-Phosphate, dans la voie de la glycolyse.

Dans l'intolérance héréditaire au fructose, maladie génétique à transmission autosomique récessive, HERS (35) et JOASSIN ont mis en évidence un déficit de l'activité Fructose-1-Phospho aldolasique (3% de la normale), alors que l'activité aldolasique vis-à-vis du F-1-6-P est relativement moins touchée (15% de la normale). Ce déficit est à l'origine d'une insuffisance hépatique sévère se traduisant selon les cas par une défaillance hépatique aiguë, ou par une cirrhose, d'évolution mortelle, en l'absence de régime d'exclusion.

HERS soulignait l'intérêt diagnostic (35) de l'élévation du rapport d'activité aldolasique F-1-6-P / F-1-P. Dans le laboratoire, le valeurs extrêmes de ce rapport, après étude de 40 biopsies, sont 2,9 à 20.

Les travaux du laboratoire ont montré que l'aldolase A du tissu hépatique avait une activité conservée (étude de l'inhibition spécifique de l'aldolase A par l'ATP ou un immunosérum anti-aldolase A). Ce type d'aldolase ne représente, dans un tissu hépatique normal, que 1 à 2% en poids de protéine, de l'ensemble des aldolases hépatiques (BLOSTEIN et RUTTER , 36); mais l'activité spécifique élevée vis-à-vis du F-1-6-P, de ce type d'aldolase, fait qu'elle assure 10 à 15% de l'activité F-1-6-P totale . F. SCHAPIRA (37).

-L'activité aldolasique C, présente en quantité non négligeable dans le foie d'embryon humain, est également décelable dans un foie adulte normal (38) F. SCHAPIRA et coll.

Sa présence en quantité relative élevée a été démontrée par électrophorèse dans le tissu hépatique d'IHF (39). Elle représente environ 50% de l'activité F-1-P aldolasique résiduelle, comme le montrent les études d'inhibition de cette aldolase par des sérums anti-aldolase C.

Cette conservation des activités aldolasiques A et C au niveau du tissu hépatique, jointe au défaut de l'activité de l'aldolase B, explique l'élévation du rapport F-1-6-P / F-1-P.

-La Km apparente pour le F-1-P, normalement égale à 3-4 mMoles, est très élevée dans l'IHF, 15 à 60 mMoles (38).

-Enfin, l'existence d'un matériel protéique donnant une réaction immunologique croisée avec un sérum anti-aldolase B a été mise en évidence par différentes techniques, au laboratoire:

. consommation d'anticorps

. immunodiffusion selon la méthode d'Ouchterlony

. immunoélectrophorèse

Son taux est variable, les chiffres les plus importants, calculés par consommation d'anticorps, augmentent et atteignent 30%, mais dans quelques cas, le CRM n'a pu être mis en évidence (37) (39) (40).

Très récemment, GITZELMANN (41) a montré que l'activité aldolasique d'extrait hépatique d'IHF pouvait être accrue par incubation préalable des extraits avec un immuno sérum anti aldolase B humain.

Les buts de ce travail ont été :

-de purifier l'aldolase B humaine normale en modifiant la technique utilisée par GURTLER et LEUTHART,

-de préciser certains caractères de l'aldolase Bnormale,

-et de comparer l'effet des réducteurs de groupement thiols sur l'aldolase B d'intolérance héréditaire au fructose, et sur l'aldolase B normale.

———

III - MATERIELS ET METHODES

A/ DOSAGE DES ACTIVITES ALDOLASIQUES

Deux méthodes sont utilisées :

-méthode colorimétrique (adaptation de la méthode de SIBLEY et LEHNINGER (42)

-méthode spectrophotométrique de BARANOWSKI et NIEDERLAND (43).

Méthode colorimétrique de SIBLEY et LEHNINGER.

-Principe.

. L'enzyme et le substrat (F1P ou F16P) sont incubés en milieu tamponné (tampon collidine), en présence d'hydrazine qui transforme les trioses phosphates libérés par l'aldolase, en hydrazones, à mesure de leur formation.

. Dans un deuxième temps, les hydrazones sont libérées de leur phosphore, par alcalinisation, puis transformées par la 2-4 dinitrophenylhydrazine acide, en ozasones.

. En milieu très alcalin, le complexe orangé formé (mélange de 2-4 dinitrophenylozasone et de methylglyoxal) vire au violet, et permet une lecture spectrophotométrique à 540 n m.

-Calcul des activités.

. Une courbe d'étalonnage a été établie en dosant, sur le même milieu réactionnel, les phosphores alcalilabiles, libérés par les trioses phosphates, selon la méthode de FISKE et SUBBAROW, et les osazones formées à partir de ces mêmes trioses phosphates.

. L'activité est exprimée en unités internationales (UI), une unité internationale correspond à la libération par minute d'une micromole de substrat (nous avons choisi de l'exprimer à 37°).

Cette méthode est précise mais longue. Elle est la méthode de choix du dosage de l'activité F-1-P aldolasique.

Méthode spectrophotométrique de BARANOWSKI et NIEDERLAND.

-Principe.

. On couple la réaction aldolasique à une réaction ∝ glycérophosphate deshydrogénasique.

. La réduction du phosphodihydroxyacétone en ∝ glycerophosphate par l'∝ glycerophosphate deshydrogénase s'accompagne de l'oxydation de la nicotineamide-dinucléotide réduite ($NADH_2$) que l'on suit par la décroissance de la densité optique à 340 nm.

. L'addition de triose phosphate isomérase en excès assure la transformation de la phosphoglyceraldehyde en phospho dihydroxyacétone

. Cette méthode permet d'apprécier l'activité aldolasique, à la condition que la production de triose phosphate qui la caractérise soit l'étape limitante de la séquence des réactions.

Cette méthode de dosage est très rapide. Elle s'applique moins bien à la mesure de l'activité F-1-P aldolasique qu'à celle de l'activité F-1-6-P aldolasique, en raison d'une inhibition, dans le premier cas, de l'aldolase par l'accumulation de l'α glyceraldehyde. La phosphoglyceraldehyde, au contraire, n'est pas inhibiteur.

Cette inhibition, due à l'accumulation de l'un des produits, n'intervient qu'après un délai de 2 à 3 minutes, dans les conditions usuelles. Ce délai est suffisant pour apprécier l'activité de préparations enzymatiques purifiées à forte activité spécifique, mais ne permet pas l'utilisation de cette méthode pour les études sur biopsies de foie.

B/ METHODES ELECTROPHORETIQUES

Trois méthodes ont été utilisées :

-électrophorèse en gel d'amidon

en gel d'acrylamide

et électrofocalisation.

Electrophorèse en gel d'amidon.

-Nous avons adapté la méthode de SMITHIES (44).

-La migration est poursuivie pendant 18 h, sous un voltage de 3 volts/cm, à + 4°.

-Le tampon phosphate citrique des cuves pH 7, 0 (phosphate disodique 0, 2 M 175 ml - acide citrique 0, 2 M 25 ml - eau qs pour 1. 000 ml), est utilisé dilué au 1/4 pour la préparation du gel dans lequel

on ajoute, pour protéger les groupements SH de l'enzyme, du β mercapto éthanol 0, 01 M.

Electrophorèse en gel d'acrylamide à 4%.

-Nous avons adapté la technique de DAVIS et ORNSTEIN (45).

-La migration est poursuivie pendant 3 h, sous un voltage assurant une intensité de courant de 5 mA/ à 4% d'acrylamide - en présence de tampon phosphate citrique pH 7, 0 -

acide citrique 0, 002 M final

phosphate disodique 0, 014 M final

et de F16P 0, 01 M

-La molarité du tampon phosphate citrique ph 7, 0 des cuves est supérieure à celle du tampon des gels :

acide citrique 0, 005 M

phosphate disodique 0, 035 M

Electrofocalisation sur disque en gel d'acrylamide.

-Le gradient de pH est réalisé par addition d'ampholine.

-Nous nous sommes inspirés de la méthode de VESTER BERG (46, et SHUSTER (47).

-Nous avons expérimenté différentes techniques. Les meilleures électrofocalisations de l'aldolase B humaine sont obtenues avec des ampholines de pH 7-9, à la concentration de 2% final.

-Les gels utilisés (acrylamide 6%) (saccharose 25%) sont polymérisés à + 4°, sous l'action de rayons UV. La polymérisation est

accélérée par l'addition en gel de :

riboflavine 0, 005 % final

persulfate d'ammonium 0, 15 % final

tetramethyl éthylène diamide ("TEMED").

-Les différentes solutions sont dégazées avant l'emploi; le gel, une fois coulé, est isolé de l'air (un peu d'eau est déposé à sa partie supérieure - la polymérisation se fait plus rapidement et de façon plus homogène, à l'abri de l'air).

-L'établissement du gradient est assuré par une préfocalisation de 2 h.

-Le dépôt de l'aldolase pure (30 ug) après dialyse de 4 h à + 4°, contre un tampon glycine 0, 013 M, pH 7, 5, sous forme d'une solution à 12, 5% de saccharose, est fait du côté de la solution de soude 0, 02 M - pH 12, 5.

Le dépôt, côté de la solution d'acide phosphorique, pH 1, 5, inactive l'enzyme.

-La migration est effectuée sous un voltage de 400 volts, pendant 18 h, à + 4°.

Une électrofocalisation simultanée d'hémoglobine humaine sert de témoin.

-Nous avons contrôlé la linéarité du gradient de pH, au terme de la migration. Il est, avec une solution d'ampholine 7-9, linéair entre 7, 95 et 6, 70.

A ces trois modes d'électrophorèse, peuvent être couplées une coloration protéique et une coloration spécifique.

-La coloration protéique est obtenue par une solution diluée de Coomassie pour les gels d'acrylamide, et par l'amido-schwartz pour les gels d'amidon.

-La coloration spécifique des aldolases (méthode de PENHOET et coll. (53) est obtenue en couplant à la réaction aldolasique la réduction du nitro Bleu de Tetrazolium, en formazan.

Les intermédiaires assurant ce couplage sont :

. La phosphoglyceraldehyde deshydrogénase qui transforme la 3 phosphoglyceraldehyde, produit de la réaction aldolasique, en 3 phosphoglycerol.

. La phenazine methosulfate qui sert de transporteur d'électrons.

. Le NAD transformé en $NADH_2$.

. Le Nitro Bleu Tetrazolium (NBT) qui, réduit en formazan bleu-violet, insoluble, permet de localiser l'enzyme.

C/ METHODES IMMUNOLOGIQUES

-Les immunserums anti-aldolase B humaine sont obtenus par injections intra-dermiques multiples : environ 40 à des lapins, selon la méthode de VAITUKAITIS (48). L'injection initiale, et les éventuels rappels, sont de 500 mg d'aldolase B purifiée, émulsionnés avec 0,5 ml d'Adjuvant complet de Freund.

L'antiserum obtenu est incubé 1 h à 56°, pour inactiver l'aldolase sérique préexistante.

-On mesure le pourcentage d'inhibition de l'activité aldolasique dans le surnageant pour apprécier l'efficacité des antisérums.

L'extrait et l'antisérum sont incubés 1 h à 37°, puis 1 h à + 4°. Les complexes formés sont précipités par centrifugation à grande vitesse.

L'activité aldolasique résiduelle du surnageant est déterminée par la méthode de SIBLEY et LEHNINGER (42).

-La détection, dans un extrait, d'aldolase B, ou d'un matériel à réaction croisée (CRM), est faite selon la méthode de double diffusion en gélose d'Ouchterlony.

-Après avoir laissé diffuser aldolases et immun sérums à + 4° pendant quelques jours, la gélose est lavée pendant 3 jours, avec du sérum salé isotonique pour éliminer les protéines n'ayant pas précipité.

L'examen en lumière réfléchie permet de déceler les arcs de précipitation des protéines, la coloration spécifique est obtenue par la méthode au nitro bleu de tétrazolium.

D/ ETUDE DE LA Km APPARENTE VIS-A-VIS DU F-1-P.

La Km vis-à-vis du F-1-P de l'aldolase B purifiée ou d'extraits hépatiques de foie normal est déterminée, pour des concentrations croissantes de F-1-P, par les méthodes graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burke.

-Par contre, seule cette seconde méthode est utilisable dans le cas des biopsies hépatiques d'intolérance héréditaire au fructose,

la quantité de matériel prélevé par biopsie à l'aiguille étant au maximum d'une dizaine de mg. Nous avons dû limiter à trois concentrations différentes de F-1-P (4 mM - 18 mM - 80 / mM) l'étude de l'activité F-1-P aldolasique. Nous avons vérifié que pour la concentration la plus élevée, la vitesse réactionnelle est la vitesse maximale.

-Les résultats obtenus en absence ou en présence de β mercapto éthanol 10 mM ont été comparés, pour l'aldolase B normale (purifiée ou non), et pour l'aldolase d'intolérance au fructose.

IV - RESULTATS

A/ PURIFICATION DE L'ALDOLASE B HUMAINE NORMALE

1°- Méthode de préparation de l'aldolase B humaine.

-Nous avons utilisé des foies humains, prélevés 7 h après le décès.

-La méthode de purification de l'aldolase B humaine est celle utilisée par le laboratoire pour la purification de l'aldolase B de Lapin.

-Elle est inspirée des méthodes de préparation de l'aldolase B de lapin mises au point par MORSE et HORECKER (49) et par PENHOET et RUTTER (31).

-La préparation comporte quatre étapes :

Extraction par une solution de glycérol,

Précipitation fractionnée par l'éthanol,

Chromatographie avec élution par le substrat,

Cristallisation par le sulfate d'ammonium.

a) Extraction par une solution de glycérol.

Un homogénat de foie humain, dilué au quart dans une solution de glycérol 25% - EDTA 10 mM, ajustée à pH 8,0 avec une solution

de NADH 0,1 N, est centrifugé à + 4°, à 10.000 g pendant 30 '.

Le surnageant est recueilli, après filtration sur gaze pour éliminer les graisses, et ajusté à pH 7,1 avec une solution normale de soude.

b) Précipitation fractionnée par l'éthanol.

Le surnageant est alors précipité à 49% par addition progressive d'alcool éthylique préalablement réfrigéré à -15°. Le surnageant est lui-même maintenu à cette température. Après agitation pendant 30 minutes, l'ensemble est centrifugé à 30.000 g, à -15°.

Le surnageant obtenu est amené ensuite à 60% de saturation d'alcool éthylique, en calculant le volume additionnel d'après la formule:

$$(S + x)\ 60 = S \times 49 + X \times 100$$

Après une nouvelle centrifugation de 30' à 30.000 g, le précipité est conservé, et dissout dans une solution à + 4°, de TRIS 5.10^{-2}M - EDTA 5.10^{-3}M - pH 7,5.

Une centrifugation, à +4°, à 100.000 g pendant 1 h, permet d'éliminer les particules les plus lourdes. On recueille le surnageant.

c) Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions et élution par le substrat F-1-6-P.

Les jours précédents, on a monté, puis lavé avec du tampon TRIS 10^{-2}M EDTA 10^{-3}M, pH 7,5, une colonne de 50 x 2 cm de phosphocellulose.

Sur cette colonne, réfrigérée à + 4°, on dépose le surnageant. On fait passer une solution tampon TRIS 5.10^{-2} M -EDTA 5×10^{-3} M pH 7,5, qui élue l'hémoglobine. Lorsque la DO de l'éluat est revenue à

la ligne de base, on élue avec le même tampon, contenant le substrat F-1-6-P $2,5 \times 10^{-3}$ M.

Sur les fractions recueillies, on dose les protéines, par lecture de la D. O. à 280 nm, et on dose l'activité aldolasique par test optique. Les fractions dont l'activité spécifique est supérieure à 1 UI/mg de protéine sont regroupées.

c) Cristallisation par le sulfate d'ammonium.

L'aldolase B est dialysée contre du sulfate d'ammonium, pH 7,5, 10%, contenant EDTA 10^{-3}M.

La concentration de sulfate d'ammonium est progressivement amenée à 55% de saturation, et l'ensemble est laissé à agiter quelques heures à température ordinaire.

Lorsque l'aldolase B est précipitée, on centrifuge à 30.000g et le précipité, redissout dans l'eau froide, est reprécipité par du sulfate d'ammonium saturé, à pH 7,5.

La principale différence entre cette méthode et celles utilisées par GURTLER et LEUTHART (16) ou par EAGLES et IQBAL (17) est que, dans les deux cas, ces auteurs réalisent la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. Nous avons choisi les précipitations à l'éthanol car elles assurent une meilleure séparation des aldolases B et A. Cette dernière existe en effet en faible quantité dans le foie normal.

Nous avons choisi la phospho cellulose car, comparativement à la carboxy-methyl cellulose, la fixation de l'aldolase B y est meilleure.

2° - Résultats de la préparation.

a) Activité aldolasique spécifique et rendement à chaque étape.

Le Tableau I donne, au terme de chaque étape, les activités F-1-6-P aldolasiques obtenues.

Tableau I

	Volume ml	Concentration Protéine /mg/ml	Activité F-1-6-P totale (UI)	Activité spécifique F-1-6-P	Rendement activité en % de l'activité initiale	Coefficient de purification
Extrait brut.....	790	120	710	0,0074		
Après précipitation alcoolique...	79	20,15	273	0,172	38,4 %	23
Après chromatographie.....	19	0,563	38,5	3,6	5,40 %	480
Après cristallisation.....	7	1,64	27,6	2,40	3,90 %	325

Remarques

-L'acitivté F-1-6-P aldolasique totale initiale est de 710 UI. Ce chiffre relativement bas, compte-tenu du poids de tissu hépatique utilisé (300 g) s'explique, au moins en partie, par le délai de prélèvement post-mortem.

-Au cours de la purification, l'activité spécifique F-1-6-P aldolasique passe de 0,007 UI à 2,40 UI par mg de protéine. Cette purification est comparable à celles obtenues par les différents auteurs (Cf Tableau II).

-Toutefois, l'activité spécifique est inférieure, et le rendement global est nettement plus bas, avec une perte très importante au cours de la chromatographie.

Tableau II

	1	2	3	4
Activité spécifique de l'extrait brut.....	0,0261 *	0,024 *	0,0195	0,0074
Activité spécifique terminale.....	4,80 *	3,3 *	2,75	2,40
Rendement global..	19 %	26 %	17 %	3,9 %

1 - D'après GURTLER et LEUTHARDT
2 - D'après EAGLES et IQBAL
3 - D'après DIKOW et PFLEIDERER
4 - Préparation du Laboratoire

* = chiffre d'activité ramené à une température de 37°.

b) Critères de pureté.

Nous avons testé la pureté de la préparation, par électrophorèse en gel d'amidon, électrophorèse en gel d'acrylamide, filtration sur gel de Sephadex, analyse immunologique et électrofocalisation.

1- Recherche des autres types d'aldolases.

. L'électrophorèse en gel d'amidon à pH 7, avec migration simultanée (Cf photo 1):

-de l'aldolase B purifiée (4)
-d'un extrait de tissu hépatique humain normal (3)
-d'un extrait de tissu musculaire humain normal (2)
-d'un extrait de tissu cérébral humain (1)

PHOTO 1 :

Electrophorèse en gel d'amidon pH 7,00

I) Extrait de cerveau humain

II) Extrait de muscle humain.

III) Extrait de foie humain normal.

IV) Aldolase B humaine purifiée.

1
2
3
4
1

montre après coloration spécifique que les aldolases humaines ont à pH 7 des charges électriques très différentes. L'aldolase C est la plus électronégative. L'aldolase A est proche de son pH isoélectrique. L'aldolase B est chargée négativement, mais beaucoup moins que l'aldolase C.

. Cette électrophorèse ne décèle pas d'hybrides de l'aldolase B, ni avec l'aldolase A, ni avec l'aldolase C.

2- Recherche de protéines non aldolasiques.

Nous les avons recherchées par différentes méthodes.

. Electrophorèse en gel d'acrylamide à 5°.

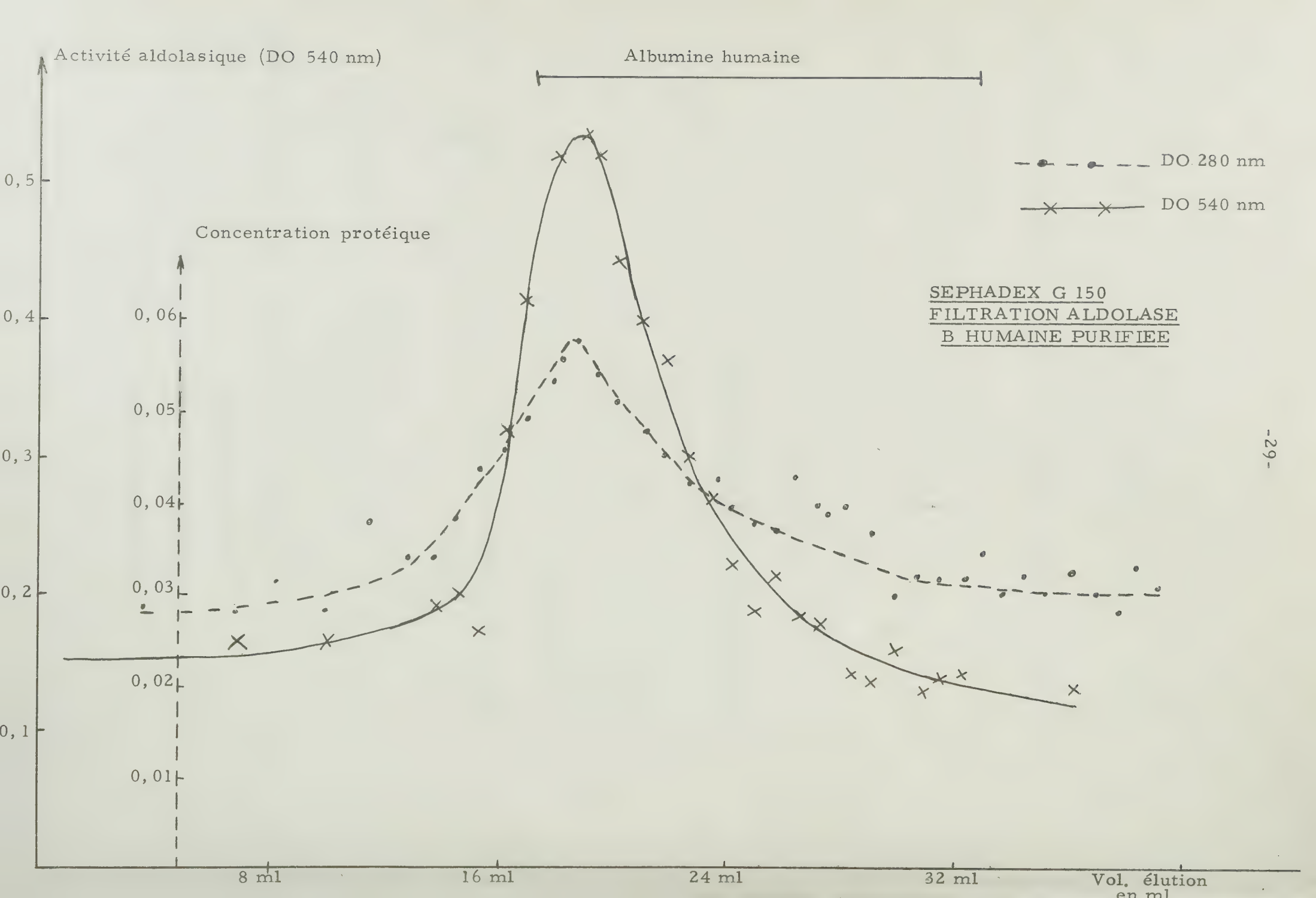
La coloration spécifique et la coloration des protéines de deux gels, après le dépôt de 50 µg d'aldolase B humaine purifiée par gel, et migration simultanée, montre une seule bande, coïncidant pour les deux systèmes de révélation, mais très étoilée.

. Filtration sur gel de Sephadex G 150 (Cf graphique ci-après).

La quantité d'aldolase B purifiée, filtrée sur une colonne de 40 xm x 1 cm, est de 250 µg.

L'élution est assurée par un tampon TRIS 0,01 EDTA 0,001 M pH 7,5.

La colonne a préalablement été testée avec une quantité équivalente d'albumine humaine. PM 60.000, et son pouvoir séparateur testé par la filtration simultanée de Bleu d'Extran, d'hémoglobine humaine et de ferricyanure.


Activité aldolasique (DO 540 nm)
Albumine humaine
DO 280 nm
DO 540 nm
Concentration protéique
SEPHADEX G 150
FILTRATION ALDOLASE
B HUMAINE PURIFIEE
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
8 ml
16 ml
24 ml
32 ml
Vol. élution en ml

Le volume des fractions d'éluat recueillies est de 0,8 ml par 5 minutes.

L'élution est suivie par :

la D. O. à 280 nm et l'activité aldolasique de chaque fraction.

La courbe de la densité optique au cours de l'élution, à 280 nm, ne comporte qu'un seul pic, correspondant au pic de l'activité aldolasique (Cf courbe (1)).

Les trois types d'aldolases ayant des poids moléculaires très proches, la filtration sur sephadex ne permet pas d'éliminer une contamination de la préparation d'aldolase B par une certaine quantité d'aldolase A ou C.

Critères immunologiques. (Cf photos 2 et 3)

. Lors de la double diffusion en gélose, d'aldolase B purifiée, et de l'antiserum obtenu chez le Lapin, contre cette aldolase B purifiée, nous n'avons observé qu'un seul arc de précipitation, colorable spécifiquement.

. Cet arc correspond à l'aldolase B, puisqu'il est retrouvé avec des extraits de tissu hépatique humain, et non avec des extraits de tissu musculaire ou cérébral.

. Par contre, un deuxième arc de précipitation, commun aux extraits hépatiques, cérébraux et musculaires, non colorable spécifiquement, est obtenu. Cet arc n'est pas observé en regard du dépôt d'aldolase B humaine purifiée.

. Néanmoins, il traduit très certainement la présence,dans la solution protéique d'aldolase purifiée, d'une protéine non aldolasique.

Cette protéine est commune aux tissus hépatiques, cérébraux et musculaires; à moins qu'il ne s'agisse d'une protéine sérique.

Electrofocalisation (Cf photo 4).

Des expériences préliminaires d'électrofocalisation ont confirmé, en effet, la présence de bandes de protéines n'ayant pas d'activité aldolasique.

Ainsi, bien que le pic d'élution de l'aldolase B, sur colonne de Sephadex, soit unique, et que l'électrophorèse en gel d'amidon ne décèle pas d'hybrides dans la préparation, celle-ci contient une ou plusieurs protéines non aldolasiques.

Ceci rend compte de l'obtention de deux anticorps distincts l'un dirigé contre l'aldolase B humaine, l'autre contre une protéine non aldolasique.

PHOTOS 2 et 3 :

Double diffusion en gélose selon la méthode d'OUTCHERLONY.

Photo 2 : Arcs de précipitation des protéines.

Photo 3 : Coloration spécifique des aldolases.

1) Extrait de foie humain normal au 1/10.

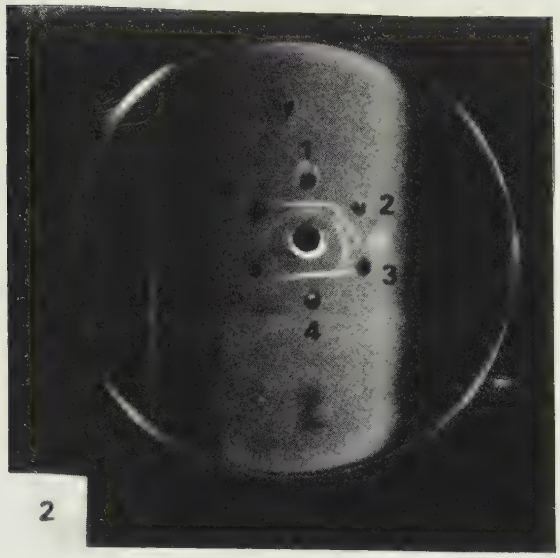
2) Extrait de foie humain normal au 1/20.

3) Extrait de muscle humain.

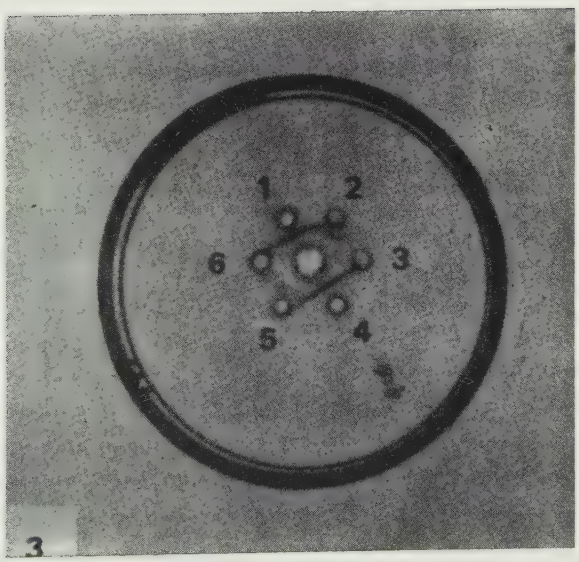
4) Aldolase B humaine purifiée.

5) Extrait de foie de Rat.

6) Extrait de cerveau humain normal.



2



3

B/ FOCALISATION PAR ELECTROPHORESE EN GRADIENT DE pH EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Les conditions techniques de cette électrofocalisation ont été exposées au chapitre "Matériel et Méthodes".

Nous avons séparé l'aldolase B humaine en plusieurs fractions, qui apparaissent nettement en coloration spécifique et en coloration protéique (Cf photo 5).

Nous constatons la présence d'au moins 4 bandes, séparables par électrofocalisation, douées d'activité aldolasique, à partir de l'aldolase B débarassée des autres isozymes.

Ce résultat confirme les travaux de GURTLER et coll. qui avaient montré, par électrofocalisation sur colonne liquide, la présence de plusieurs pics différents dans l'aldolase B humaine purifiée. Ils individualisent jusqu'à cinq pics, plus ou moins bien séparés, et supposent l'existence de deux types de sous-unités β et β' donnant :

$\beta_4 \beta_3 \beta'$ $\beta_2 \beta$ $\beta_3 \beta_3$ β'_4

Il est vrai que nous séparons 4 bandes et non 5. Mais les pics à pHi les plus acides, obtenus par GURTLER, sont extrêmement réduits, ce qui peut expliquer la difficulté que nous avons à caractériser ceux-ci en gel d'acrylamide.

De plus, le profil d'élution de ces auteurs montre une assymétrie des pics, importante, qui laisse supposer que les deux types (β et β') de sous-unités sont dans un rapport différent de 1. Si

B/ FOCALISATION PAR ELECTROPHORESE EN GRADIENT DE pH EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Les conditions techniques de cette électrofocalisation ont été exposées au chapitre "Matériel et Méthodes".

Nous avons séparé l'aldolase B humaine en plusieurs fractions, qui apparaissent nettement en coloration spécifique et en coloration protéique (Cf photo 5).

Nous constatons la présence d'au moins 4 bandes, séparables par électrofocalisation, douées d'activité aldolasique, à partir de l'aldolase B débarassée des autres isozymes.

Ce résultat confirme les travaux de GURTLER et coll. qui avaient montré, par électrofocalisation sur colonne liquide, la présence de plusieurs pics différents dans l'aldolase B humaine purifiée. Ils individualisent jusqu'à cinq pics, plus ou moins bien séparés, et supposent l'existence de deux types de sous-unités β et β' donnant :

$\beta_4 \beta_3 \beta'$ $\beta_2 \beta$ $\beta_3 \beta_3$ β'_4

Il est vrai que nous séparons 4 bandes et non 5. Mais les pics à pHi les plus acides, obtenus par GURTLER, sont extrêmement réduits, ce qui peut expliquer la difficulté que nous avons à caractériser ceux-ci en gel d'acrylamide.

De plus, le profil d'élution de ces auteurs montre une assymétrie des pics, importante, qui laisse supposer que les deux types (β et β') de sous-unités sont dans un rapport différent de 1. Si

le mécanisme de formation des sous-unités $\beta\beta'$ est analogue à celui des sous-unités $\alpha\alpha'$ de l'aldolase A de Lapin, c'est-à-dire une déamidification in vivo, on peut supposer que le renouvellement de l'aldolase hépatique plus rapide que celui de l'aldolase musculaire est responsable de l'excès de sous-unités β , comparée aux sous-unités β' de pHi plus acide.

PHOTOS 4 et 5 :

-Electrofocalisation d'aldolase B humaine purifiée en gel d'acrylamide pH 7, 95 à 6, 00

-Le gel situé à gauche, sur chacune des photos, correspond à la coloration des protéines.

-Le gel situé à droite correspond à la coloration spécifique de l'aldolase.

C/ EFFETS DES REDUCTEURS DES GROUPEMENTS THIOLS SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ALDOLASE B HUMAINE, ET SUR SON AFFINITE ENVERS LE FRUCTOSE 1 PHOSPHATE.

1° Effets sur l'activité catalytique.

-Nous avons mesuré l'activité catalytique vis-à-vis des substrats F-1-6-P et F-1-P d'extraits obtenus à partir de plusieurs biopsies hépatiques de malades atteints d'intolérance héréditaire au fructose.

-Ces mesures ont été faites à partir d'extraits au 1/50ème par la méthode colorimétrique de SIBLEY-LEHNINGER. Les mesures faites lors d'une extraction dans l'eau ont été comparées à celles faites lors d'une extraction en présence de β-mercapto ethanol 10 mM.

-Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec un extrait de tissu hépatique normal, et avec l'aldolase B purifiée. Les activités spécifiques sont exprimées en unités internationales (UI) par gramme de tissu hépatique frais, pour une température de 37°C.

Les résultats sont regroupés dans les tableaux III et IV ci-après.

-De l'analyse des résultats regroupés dans ces tableaux on note que :

Tableau III

Extrait de tissu hépatique d'IHF	Extraction eau			Extraction B merc 10 mM			Δ Act F16P	Δ Act F1P
	Act F16P UI/gr	Act F1P UI/gr	Rapport F16P / F1P	Act F16P UI/gr	Act F1P UI/gr	Rapport F16P / F1P		
M....X	0,68	0,09	7,26	1,32	0,52	2,50	+ 100%	+ 480
M....D	0,95	0,11	8,60	1,04	0,43	2,40	+ 9%	+ 300
M....S		0,14		1,84	0,36	5		+ 160
G....		0,11		1,76	0,43	4,1		+ 300
L....F	1,84	0,17	10,8	2,4	0,27	8,9	+ 30%	+ 60
M.... X*	0,68	0,06	11	0,88	0,22	4	+ 30%	+ 35

* Extraction faite en présence de dithiothreitol, 0,01 M.

Tableau IV

	Extraction eau			Extraction B merc 10 mM			Δ Act F16P	Δ Act F1P
	Act F16P UI/gr	Act F1P UI/gr	Rapport F16P / F1P	Act F16P UI/gr	Act F1P UI/gr	Rapport F16P / F1P		
Aldolase B* purifiée 2ème préparation	1,23	0,83	1,48	1,8	1,4	1,28	+ 46%	+ 68
Extrait hépatique normal	5,30	4,26	1,34	5,25	4,40	1,20	0	+ 3
Extrait cerveau humain normal	3,75 à 6	0,25 à 0,40	15	3,75 à 6	0,25 à 0,40	15		

* Activité spécifique rapportée, dans ce cas, au mgr de protéine purifiée.

.Dans la presque totalité des cas, en présence de β mercapto éthanol, est observée une augmentation de l'activité F-1-P aldolasique. Cette augmentation peut être très importante (jusqu'à 500 %).

. Des études préliminaires, faites en présence de dithiothreitol, semblent aboutir au même résultat. Les effets du dithiothreitol doivent toutefois être confirmés par de nouveaux dosages.

. L'activité F-1-6-P aldolasique subit également en présence de β mercapto éthanol une élévation. Cette élévation est beaucoup plus modérée, le maximum observé est de 100% d'augmentation.

-Ces modifications inégales des activités aldolasiques ont pour conséquence une diminution du rapport de ces activités F-1-6-P / F-1-P. Dans certains cas, le rapport,qui est l'un des critères biochimiques les plus fiables pour établir le diagnostic d'intolérance héréditaire au Fructose,approche de valeurs normales. Certes, dans ces cas, les chiffres très abaissés de l'activité F-1-P aldolasique permettent-ils détablir le diagnostic d'intolérance héréditaire au Fructose, mais, afin d'éviter toute ambiguité, il est préférable de déterminer ce rapport à partir d'un extrait hépatique obtenu en l'absence de réducteurs des groupes thiols.

2°- Effets des réducteurs des groupements thiols sur l'affinité pour le F-1-P, de l'aldolase B modifiée d'intolérance héréditaire au Fructose.

Les trois types d'aldolases A, B et C, coexistent dans le

tissu hépatique normal, comme dans celui de malade atteint d'IHF (50). Or, le type C, à la différence du type A, possède une activité non négligeable pour le F-1-P.

-Aussi, la constante de MICHAELIS (Km), pour le F-1-P, mesurée à partir d'un extrait hépatique, est la résultante de l'affinité non seulement de l'aldolase B, mais aussi de l'aldolase C. Nous l'appelerons constante apparente de MICHAELIS.

-Lorsque cette constante est déterminée à partir d'un extrait hématique normal, la part de l'activité F-1-P assurée par les aldolases A et C, est peu importante. On constate d'ailleurs que la valeur obtenue est très proche de celle de l'aldolase B purifiée.

-Ces mesures ont été faites à partir d'extraits hépatiques au 1/50ème, en présence ou en l'absence de β mercapto éthanol 10 mM.

-En raison de la quantité très limitée de matériel fourni par les biopsies hépatiques faites à l'aiguille, la Km apparente est déterminée seulement pour trois concentrations préalablement choisies de F-1-P. Elle n'est donc qu'approximative.

-Les résultats sont regroupés dans les tableaux V et VI ci-après.

Deux conclusions se dégagent de ces tableaux :

1-Les valeurs de la Km apparente, pour le F-1-P, des extraits hépatiques d'IHF sont élevées (> 10 mM). Ceci confirme les travaux antérieurs du laboratoire.

Tableau V

Extrait de foie d'IHF	Km (eau)	Km (β Mercapto éthanol 10 mM)	Km (Dithiothreithol 10 mM)
M.... X	> 20 mM	< 3 mM	< 3
M.... D	10 - 15	< 3	
M.... S	10 - 15	3 - 4	
G....	> 20	< 3	
C.... M	> 20	< 3	
C.... F	> 10		< 3

Tableau VI

	Km eau	Km Merc. 10 mM
Aldolase B humaine purifiée	5 mM	5 mM
Extrait tissu hépatique humain normal	3-5 mM	3-5 mM
Extrait tissu cérébral humain	14-18 mM	14-18 mM

2-Surtout, en présence de β mercapto éthanol 10 mM, la Km apparente est ramenée à des valeurs normales.

Un effet analogue du β mercapto éthanol n'a pas été retrouvé avec l'aldolase B normale, qu'elle soit purifiée ou non. (Cf tableau IV).

Il est obtenu, par contre, avec d'autres agents réducteurs, comme en témoignent les deux dosages faits en présence de dithiothreitol. Toutefois, les effets de ce produit, bien que notés sur deux extraits différents, doivent être confirmés par d'autres dosages.

3°- Discussion des effets du β mercapto-éthanol sur l'affinité et sur l'activité des aldolases hépatiques de malades atteints d'IHF.

a) Effet sur l'affinité vis-à-vis du F-1-P.

-Ladiminution de la constante apparente de MICHAELIS traduit une augmentation de l'affinité pour le F-1-P de l'une ou de plusieurs des aldolases contenues dans un extrait hépatique de malade atteint d'IH

-Plusieurs arguments permettent de rattacher cet effet du β mercapto éthanol à la seule aldolase B modifiée :

. La Km apparente pour le F-1-P mesurée sur un extrait hépatique d'IH après précipitation immunologique de l'aldolase C demeure élevée. F. SHAPIRA et coll. (39). L'aldolase A n'ayant de son côté qu'une activité F-1-P aldolasique négligeable au niveau hépatique, l'élévation de la KM vis-à-vis du F-1-P est bien due à l'altération de l'aldolase B.

. La KM pour le F-1-P d'un extrait de tissu cérébral (aldolases A et C) n'est pas modifiée par le β mercapto éthanol (Cf tableau VI).

De même, celui-ci a peu ou pas d'effet sur la Km de l'aldolase B purifiée normale, non plus que sur la Km apparente d'un extrait hépatique humain normal (Cf Tableau VI).

Le retour, sous l'effet de réducteurs des groupes thiols, de la constante apparente de MICHAELIS à des valeurs normales, parait donc bien dû à une action de ces réducteurs sur l'aldolase B modifiée.

b) Effet sur l'activité catalytique vis-à-vis du F-1-P.

-L'élévation, sous l'influence des réactivateurs des thiols, de l'activité F-1-P aldolasique, d'un extrait de tissu hépatique de malade atteint d'IHF, parait également la conséquence de leur action sur l'aldolase B modifiée, étant donné l'absence d'effets notables de ces mêmes agents réducteurs sur l'activité F-1-P aldolasique des aldolases A, B et C normales. (Cf Tableau IV).

Toutefois, l'augmentation de l'activité catalytique, importante en valeur relative, l'est moins en valeur absolue. Seule une étude faite après précipiration immunologique de l'aldolase C permettrait de s'assurer de l'action du β mercapto éthanol sur la seule aldolase B modifiée.

4°- Mécanisme de l'action du β Mercapto éthanol sur l'aldolase B d'IHF.

-L'action du β mercapto éthanol et du dithothreitol suggère que, de façon directe ou indirecte, la mutation structurale de l'Aldo-

lase B modifiée est responsable de l'oxydation de groupements thiols. Cette oxydation retentissant à son tour sur l'activité catalytique et l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du F-1-P.

-Les résultats expérimentaux ne permettent pas de savoir si l'état oxydé de ces groupements thiols préexiste ou non à l'extraction. Retenir la seconde hypothèse reviendrait à admettre que certains groupements thiols soient plus facilement oxydables au niveau de l'enzyme muté que dans l'aldolase B normale.

-Nous sommes tentés de rapprocher ces données des résultats obtenus par STEINMANN et RICHARDS (51) avec l'aldolase A de Lapin. La fixation, sur le groupement SH du site actif de l'enzyme, de radicaux disulfite monosulfoxide, accroit la Km de cet enzyme, pour le F-1-6-P et pour le F-1-P.

-Si l'on considère, d'une part, la similitude de structure primaire d'un même type d'aldolase, entre différentes espèces, et d'autre part, à l'intérieur d'une même espèce, la similitude encore plus étroite, des structures des sites actifs d'aldolase de type différent (A, B et C de Lapin) (52), on peut envisager que l'aldolase B humaine contienne dans son site actif un groupement thiol.

-Les exemples de l'influence de réactifs thiols sur l'affinité d'enzymes mutants sont encore très peu connus chez les eucaryotes Récemment, cependant, VAN BERKEL et coll. (53) ont montré que le β mercapto éthanol normalise la cinétique de la pyruvate kinase vis-à-vis du phospho enol pyruvate, dans un cas d'anémie hémolytique, par déficit de l'enzyme érythrocytaire.

V - RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons purifié l'aldolase B normale humaine par une méthode nouvelle, et obtenu une enzyme à bonne activité spécifique.

Nous avons obtenu, par électrophorèse en gradient de pH, sur gel d'acrylamide, la focalisation en plusieurs bandes de l'aldolase. Cette séparation de fractions au sein de l'aldolase de type B avait déjà été obtenue, mais en colonne liquide, avec des quantités d'enzymes beaucoup plus importantes.

L'incubation d'extraits de tissu hépatique de malades atteints d'intolérance héréditaire au Fructose, en présence de β mercapto éthanol, abaisse la constante de MICHAELIS de l'aldolase B modifiée jusqu'à des valeurs normales, et accroit sensiblement l'activité F-1-P aldolasique de cet extrait, abaissant le rapport des activités aldolasiques F-1-6-P / F-1-P. La mesure, dans un but de diagnostic, de ces caractéristiques cinétiques, gagne donc à être faite sur des extraits préparés en l'absence de réducteurs des groupements thiols.

Les effets de ces réducteurs sur l'aldolase B d'intolérance héréditaire au Fructose suggèrent que, par un mécanisme direct ou indirect, la lésion génétique de la maladie est responsable de l'oxydation de groupements thiols, oxydation qui concourt à l'altération de l'activité catalytique de l'aldolase B.

———

Vu, Le Président de Thèse :

Professeur J. C. DREYFUS

Vu, Le Doyen de la Faculté PARIS-SUD :

Professeur ETIENNE

Lu et approuvé :

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET

VI - BIBLIOGRAPHIE

1 - (W. J. RUTTER :
The Enzymes, 1961, 9, 253

2 - (O) WARBURG, (W) CHRISTIAN :
Biochemistry, 1943, 149, 314

3 - (HG) HERS, (T) KUSAKA, (D. E.) DUVEC, VORTRAG :
Second International Congress of Biochemistry
Paris, 1952, 7, 21

4 - (HG) HERS, (T) KUSAKA :
Bioch. Biophys. Acta, 1953, 11, 427

5 - (F) LEUTHARDT, (E) TESTA, (HP) WOLF :
Helv. Chim. Acta, 1953, 36, 227

6 - (F) LEUTHARDT, (E) TESTA, (HP) WOLF :
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 1952, 10, 57

7 - (F) LEUTHARDT, (HP) WOLF:
Helv. Chim. Acta, 1954, 37, 1734

8 - (HG) HERS :
Métabolisme du Fructose, 1957, 91 - Ed ARSCIA, Bruxelles

9 - (F) SCHAPIRA :
Bull. Soc. Chim. et Biol., 1961, 43, 1367

10 - (F) SCHAPIRA :
Bull. Soc. Chim. et Biol., 1961, 43, 1359

11 - (RJ) PEANASKY, (HA) LARDY :
J. Biol. Chem., 1958, 233, 365

12 - (E) PENHOET, (T) RAJKUMAR, (WJ) RUTTER :
Proc. Nation. Acad. Sci., 1966, 56, n° 4, 1275

13 - (U) RENSING, (A) SCHMID, (P) CHRISTEN, (F) LEUTHARDT :
Hoppeseyler's S. Physiol. Chem., 1967, 348, 1001

14 - (BL) HORECKER, (RW) GRACY, (AG) LACKO :
J. Biol. Chem., 1969, 244, n° 14, 3913

15 - (J) RUTTER, (BM) WOODFIN, (RE) BLOSTEIN :
Acta Chem. Scand., 1963, 17, 266

16 - (B) GÜRTLER, (C) BALLY, (F) LEUTHARDT :
Hoopeseyler's S Physiol. Chem., 1971, 352, 1455

17 - (PA) EAGLES, (M) IQBAL :
Biochem. J., 1973, 133, 429

18 - (E) PENHOET, (M) KOCHMAN, (R) VALENTINE, (WJ)RUTTER :
Biochemistry, 1967, 6, n° 9, 2940

19 - (HG) LEBHERZ, (WJ) RUTTER :
Biochemistry, 1969, 8, 109

20 - (HG) LEBHERZ :
Developmental Biol., 1972, 27, 143

21 - (CP) WEBER :
Fructose Diphosphate aldolase homologs in embriological development. PhD Thesis - University of Illinois, Urbana, Illinois.

22 - (CS) WEBER, (WJ) RUTTER :
Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 1964, 23, 487

23 - (Y) NORDMANN, (F) SCHAPIRA :
Eur. J. Cancer, 1967, 3, 247

24 - (F) SCHAPIRA, (A) HATZFELD, (MD) REUBER :
Cancer Research, 1971, 31, 1224

25 - (W) CHAN, (DE) MORSE, (BL) HORECKER :
Proc. Nation. Acad. Sci., 1967, 57, n° 4, 1013

26 - (WA) SUSOR, (M) KOCHMAN, (WJ) RUTTER :
Ann. New York Acad. of Sci., vol. 209, 328

27 - (CY) LAI, (C) CHEN, (BL) HORECKER :
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 40, 461

28 - (CF) MIDLEFORT, (AH) MEHLER :
Proc. Nation. Acad. Sci., 1972, 69, n° 7, 1816

29 - (M) KOIDA, (CY) LAI, (BL) HORECKER :
Arc. Biochem. Biophys., 1969, 134, 623

30 - (TU) RAJKUMAR, (BM) WOODFIN, (WJ) RUTTER :
Methods in Enzymology, 1966, 9, 491

31 - (E) PENHOET, (M) KOCHMAN, (WJ) RUTTER :
Biochemistry, 1969, 8, 4391

32 - (RW) GRACY, (AG) LACKO, (BL) HORECKER :
J. Biol. Chem., 1969, 244, 3913

33 - (AL) DIKOW, (F) FALKENBERG, (G) PFEIDERER :
Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem., 1974, 355, 233

34 - (B) GURTLER, (F) LEUTHARDT :
Helv. Chim. Acta, 1970, 53, 654

35 - (HG) HERS, (G) JOASSIN :
Enzymologica Biologica et Clinica, 1961, 1, n° 1, 4

36 - (R) BLOSTEIN, (WJ) RUTTER :
J. Biol. Chem., 1963, 328, 3280

37 - (F) SCHAPIRA, (Y) NORDMANN, (JC) DREYFUS :
Rev. Fr. Et. clin. et biol., 1968, 13, 267

38 - (F) SCHAPIRA, (Y) NORDMANN :
Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 189

39 - (F) SCHAPIRA, (A) HATZFELD, (C) GREGORI :
Enzyme, 1974, 18, 73

40 - (F) SCHAPIRA, (Y) NORDMANN ;
Biochimie, 1972, 54, 741

41 - (R) GITZELMAN, (B) STEINMANN, (C) BALLY, (HG) LEBHERZ:
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1974, 59, n° 4, 1.

42 - (JA) SIBLEY, (A) LEHNINGER:
J. Biol. Chem., 1949, 177, 859

43 - (T) BARANOWSKI, (T) NIEDERLAND:
J. Biol. Chem., 1949, 180, 543

44 - (O) SMITHIES :
Adv. In Prot. Chem., 1959, 14, 66

45 - (H) DAVIS, ORNSTEIN :
Ann. New York Acad. Sci., 1964, 121, 321

46 - (O) VESTERBERG :
Protides of the Biol. Fluid. 1969, 17, 383

47 - (L) SHUSTER :
Methods in Enzymology, 22, 412

48 - (J) VAITYKAITIS, (JB) ROBBINS, (E) NIESCHLAG, (GT) ROSS :
J. Clin. End., 1971, 33, 988

49 - (DE) MORSE, (BL) HORECKER :
Arch. Bioch. Biophys., 1968, 125, 942

50 - (F) SCHAPIRA, (Y) NORDMANN, (C) GREGORI :
Symposium on clinical and metabolic aspects of fructose, 197?
77

51 - (HM) STEINMANN, (FM) RICHARDS :
Biochemistry, 1970, 9, 4360

52 - (BL) HORECKER, (O) TSOLAS, (CY) LAI :
The Enzymes, 1972, 7, 212 - Boyer Ed.

53 - (JC) VANBERKEL, (GEJ) STAAL, (JF) KOSTER, JG) NYESSEN:
Biochim. Biophys. Acta, 1974, 334, 361

54 - (F) LEMONNIER, (C) GREGORI, (F) SCHAPIRA:
Biochem. Biophys. Res. Comm.